



RECEIVED

OCT 31 2002 1632

TECH CENTER 1600/2900

**CERTIFICATE OF MAILING**

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail in an envelope addressed to: Assistant Commissioner for Patents, Washington, DC 20231, on October 18, 2002

By:

/ **Ruth Montalvo**

Date: 10/18/02

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

Customer No. 026418

Docket No. JG-YY-5118/500569.20083

Applicant(s): Yoshihide IWAKI, et al.

Serial No.: 10/021,840

Group:

Filed: December 13, 2001

Examiner:

For: **BLOCKING OF DEVICE FOR DETECTING BIOCHEMICALLY ACTIVE MOLECULES**

#2/Priority  
Paper  
mail  
11/1/02

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

**SUBMISSION OF THE JAPANESE PRIORITY DOCUMENT**

Sir:

In the above-identified application, applicant(s) submits herewith certified copy(ies) of the following basic application(s):

Country:  
JAPAN

No.  
2000-379332

Filing Date:  
December 13, 2000

priority(ies) of which is(are) claimed under 35 U.S.C. § 119.

Acknowledgement is hereby requested

Respectfully submitted,

October 18, 2002  
JEG:dej

Jules E. Goldberg  
Reed Smith LLP  
599 Lexington Avenue  
New York, NY 10022

Tel. No. (212) 521-5403  
Enclosure:  
Japanese Priority Document



日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

10/021,840

RECEIVED

OCT 31 2002

TECH CENTER 1600/2900

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年12月13日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-379332

出 願 人

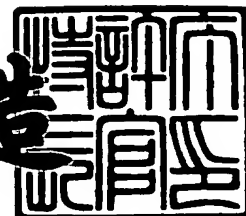
Applicant(s):

富士写真フイルム株式会社

2001年 8月31日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3080012

【書類名】 特許願

【整理番号】 863245

【提出日】 平成12年12月13日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/11

【発明の名称】 プローブ分子が固定された検出具の処理方法及び水性処理液

【請求項の数】 25

【発明者】

    【住所又は居所】 埼玉県朝霞市泉水 3 - 1 1 - 4 6 富士写真フイルム株式会社内

    【氏名】 岩木 義英

【発明者】

    【住所又は居所】 埼玉県朝霞市泉水 3 - 1 1 - 4 6 富士写真フイルム株式会社内

    【氏名】 篠木 浩

【発明者】

    【住所又は居所】 埼玉県朝霞市泉水 3 - 1 1 - 4 6 富士写真フイルム株式会社内

    【氏名】 瀬志本 修

【特許出願人】

    【識別番号】 000005201

    【氏名又は名称】 富士写真フイルム株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100074675

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 柳川 泰男

    【電話番号】 03-3358-1798

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 055435

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 プローブ分子が固定された検出具の処理方法及び水性処理液

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 固相担体の表面に備えられた一群の荷電性の反応性基 X に、一方の端部もしくはその近傍に該反応性基 X と反応して共有結合を形成する反応性基 E を持ち、他方の端部もしくはその近傍に反応性基 E と同一もしくは異なる反応性基 G を有する化合物を反応させることにより作成した、先端部もしくはその近傍に反応性基 G を有する一群の反応性連結基を備えた反応性固相担体に、該反応性基 G と反応して共有結合を形成する反応性基 Q を一方の端部もしくはその近傍に持つ一群のプローブ分子を接触させることによって、該反応性基 Q と反応性基 G との反応により生成する共有結合を介して、連結基にプローブ分子を結合させることにより製造した、該プローブ分子に特異的に結合する試料分子を結合固定するための試料分子の検出具の検出特性を向上させる方法であって、該検出具に対して、荷電性の反応性基 X が水性媒体中で示す電荷と逆側の電荷を水性媒体中で示す荷電性化合物と接触させる処理、及び反応性基 G と反応して、その反応性基 G を不活性化する化合物を接触させる処理とを含むブロック処理を水性媒体の存在下にて施し、次いで洗浄処理を施すことからなる方法。

【請求項 2】 検出具のブロック処理の際に用いる水性媒体に界面活性剤が含まれている請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 界面活性剤が陰イオン性界面活性剤である請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】 荷電性の反応性基 X が水性媒体下で示す電荷が正であり、ブロック処理に用いる荷電性化合物が水性媒体中で示す電荷が負である請求項 1 に記載の方法。

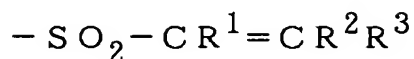
【請求項 5】 荷電性の反応性基 X がアミノ基であって、ブロック処理に用いる荷電化合物がデキストラン硫酸である請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】 反応性基 E がエチレン性不飽和基である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】 反応性基 E が下記の式で表わされるビニルスルホニル基もし

くはその誘導体である請求項 1 に記載の方法：

【化 1】



〔上記式において、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 及び $\text{R}^3$ は、互いに独立に、水素原子、炭素原子数が 1 乃至 6 のアルキル基、炭素原子数が 6 乃至 20 のアリール基、及び炭素原子数が 1 乃至 6 のアルキル鎖を有する合計炭素原子数が 7 乃至 26 のアラルキル基からなる群より選ばれる原子もしくは基を表わし；そして、L は、正負のうちの少なくとも一方の電荷を持つ部位を有する連結基を表わす〕。

【請求項 8】 反応性基 G がエチレン性不飽和基である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】 反応性基 G が下記の式で表わされるビニルスルホニル基もしくはその誘導体である請求項 1 に記載の方法：

【化 2】



〔上記式において、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 及び $\text{R}^3$ は、互いに独立に、水素原子、炭素原子数が 1 乃至 6 のアルキル基、炭素原子数が 6 乃至 20 のアリール基、及び炭素原子数が 1 乃至 6 のアルキル鎖を有する合計炭素原子数が 7 乃至 26 のアラルキル基からなる群より選ばれる原子もしくは基を表わし；そして、L は、正負のうちの少なくとも一方の電荷を持つ部位を有する連結基を表わす〕。

【請求項 10】 反応性基 Q がアミノ基もしくはメルカプト基である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】 反応性基 G と反応して、その反応性基 G を不活性化する化合物がアミノ基含有化合物である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】 アミノ基含有化合物がグリシンである請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】 上記プローブ分子が、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、およびペプチド核酸からなる群から選ばれるヌクレオチド誘導体もしくは

その類縁体である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】 試料分子が、蛍光標識を備えた核酸断片である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】 蛍光標識が水性媒体中で負の電荷を示す蛍光標識である請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】 正の電荷を示すアミノ基含有化合物、負の電荷を示す酸性化合物、そして陰イオン性界面活性剤が水性媒体に溶解されてなる水性組成物。

【請求項 1 7】 正の電荷を示すアミノ基含有化合物がグリシンであり、負の電荷を示す酸性化合物がデキストラン硫酸である請求項 1 6 に記載の水性組成物。

【請求項 1 8】 固相担体の表面に備えられた一群の荷電性基に、該荷電性基が水性媒体中で示す電荷と逆側の電荷を水性媒体中で示す荷電性基を一方の端部もしくはその近傍に持つ一群のプローブ分子を接触させることによって、該プローブ分子を固相担体の表面に静電結合により固定して製造した、該プローブ分子に特異的に結合する試料分子を結合固定するための試料分子の検出具の検出特性を向上させる方法であって、該検出具に対して、固体表面に備えられた荷電性基が水性媒体中で示す電荷と逆側の電荷を水性媒体中で示す荷電性化合物と接触させる処理を含むブロック処理を水性媒体の存在下にて施し、次いで洗浄処理を施すことからなる方法。

【請求項 1 9】 検出具のブロック処理の際に用いる水性媒体に界面活性剤が含まれている請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】 界面活性剤が陰イオン性界面活性剤である請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】 固相担体の表面に備えられた荷電性基がアミノ基であり、プローブ分子の荷電性基がリン酸基である請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 2】 固相担体の表面に備えられた荷電性基がアミノ基であり、ブロック処理に用いる荷電化合物がデキストラン硫酸である請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 3】 試料分子が、蛍光標識を備えた核酸断片である請求項 1 8

に記載の方法。

【請求項 2 4】 蛍光標識が水性媒体中で負の電荷を示す蛍光標識である請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】 ブロック処理を、デキストラン硫酸、グリシン、そして界面活性剤からなる水性組成物で行なう請求項 1 8 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、生体高分子物質の構造の解析に有用な検出用具に関し、特に遺伝子の発現、変異、多型等の効率的な解析に有用な、多数の生物起源の高分子物質もしくはその類縁体を固相担体表面に整列固定させた検出用具に関する。本発明は特に、DNA断片試料の塩基配列の解析に有用な、多数のヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体を固相担体表面に高密度に整列固定させた高密度アレイ型検出用具（DNAチップ）に代表される試料分子の検出用具の検出感度あるいは検出精度などの検出特性を向上させる方法に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

多様な生物の遺伝子機能を効率的に解析するための技術開発が急速に進んでおり、生物のDNAもしくはDNA断片の塩基配列の解析のために、DNAチップとよばれる、多数のDNA断片あるいは合成オリゴヌクレオチドなどのヌクレオチド誘導体を固相基板の表面に固定した検出用具が用いられている。このような固相基板の表面に結合固定されたヌクレオチド誘導体のような検出用分子は、プローブ分子とも呼ばれ、そのプローブ分子と特異的な結合をする特定の試料分子を結合固定することができる。従って、DNAチップを用いることにより、そのDNAチップのプローブ分子に特異的に結合する試料分子を固定検出することが可能になる。

【0 0 0 3】

代表的なDNAチップは、スライドガラス等の固相担体に多数のプローブ分子を整列固定させたマイクロアレイである。このようなDNAチップの製造、そし



てその使用に関するDNAチップ関連技術は、DNA以外の生体分子の検出にも利用可能であり、従って、創薬研究、疾病の診断や予防法の開発等に新しい手段を提供するものとして期待されている。

## 【0004】

DNAチップ関連技術が具体化してきたのは、DNAの塩基配列をオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによって決定する方法が創案されたことに始まる。この方法は、ゲル電気泳動を用いる塩基配列決定法の限界を克服できる方法ではあったが、当初は実用化には至らなかった。

## 【0005】

その後、前記のような構成のDNAチップと、その作成技術が開発され、遺伝子の発現、変異、多型等を短時間で効率よく調べることが可能となった。すなわち、作成されたDNAチップ上のDNA断片もしくはオリゴヌクレオチドなどのプローブ分子に相補性を示すDNA断片試料（標的DNA断片）は通常、DNAチップ上のプローブ分子と、標識したDNA断片試料とのハイブリダイゼーションを利用して検出される。

## 【0006】

DNAチップ作成技術を実用化するためには、多数のDNA断片やオリゴヌクレオチドを固相担体表面に高密度に、かつ安定に整列固定させるための技術が必要となり、また、DNAチップの検出感度あるいは検出精度などの検出特性が重要となる。そのため、固相担体表面に十分な量で（すなわち、高密度に）、かつ安定にDNA断片が結合固定することが、プローブ分子と標識した試料核酸断片とのハイブリダイゼーションの検出特性の向上に重要となる。

## 【0007】

DNAチップの作成方法としては、固相担体表面で直接、オリゴヌクレオチドを合成する方法（オン・チップ法）と、予め調製用意したDNA断片あるいはオリゴヌクレオチドを固相担体表面に結合固定する方法とが知られている。オン・チップ法としては、光照射で選択的に除去される保護基の使用と、半導体製造に利用されるフォトリソグラフィ技術および固相合成技術とを組み合わせ、所定の微少なマトリックス領域でのオリゴヌクレオチドの選択的な合成を行なう方法

(マス킹技術) が代表的である。

【0008】

予め調製用意したDNA断片やオリゴヌクレオチドを固相担体表面に結合固定する方法としては、DNA断片の種類や固相担体の種類に応じて下記の方法が知られている。

【0009】

(1) 固相担体に固定するプローブ分子がcDNA (mRNAを鋳型にして合成した相補的DNA) あるいはPCR産物 (cDNAをPCR法によって増幅生産させて得たDNA断片) などのDNA断片である場合には、DNA断片を、DNAチップ作成装置に備えられたスポット装置により、予めポリ陽イオン化合物 (例、ポリリシン、ポリエチレンジイミン) で表面処理したガラス板などの固相担体の表面に点着し、点着したDNA断片の持つ電荷を利用して固相担体表面に静電的に結合固定させる方法が利用される。なお、固相担体表面の処理方法としては、アミノ基等の活性基を有するシランカップリング剤を用いる方法も利用されている。

【0010】

(2) 固相担体に固定するプローブ分子が合成オリゴヌクレオチドである場合には、予め反応活性基を導入したオリゴヌクレオチドを調製し、このオリゴヌクレオチドを含む水溶液を、別に予め反応性基を形成させるように表面処理した固相担体表面に点着して、該オリゴヌクレオチドを固相担体表面に共有結合により結合固定させる方法が利用される。この共有結合を利用する固定方法の例としては、表面にアミノ基を導入したスライドガラスに、PDC (p-フェニレンジイソチオシアネート) の存在下、アミノ基導入オリゴヌクレオチドを反応させる方法、および該スライドガラスに、アルデヒド基導入オリゴヌクレオチドを反応させる方法が知られている。これらの方法は、前記(1)のDNA断片の電荷を利用して静電結合により固定する方法と比べると、オリゴヌクレオチドが固相担体表面に安定に結合固定されるという利点がある。

【0011】

なお、近年、DNAチップのプローブ分子として、オリゴヌクレオチドもしくは

はポリヌクレオチド（合成されたオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチド及びDNA分子やDNA断片、そしてRNA分子やRNA断片をも包含する）の代りに、PNA（ペプチド核酸）と呼ばれるオリゴヌクレオチド類縁体を用いる技術も提唱されている。このPNAの固相基板へ共有結合により固定するための方法として、アビジンとビオチンとを組合わせて用いる方法も知られている（特開平11-332595号公報）。

## 【0012】

上記の公開公報には、固相基板として、表面プラズモン共鳴（SPR）バイオセンサを利用することの技術も記載されている。表面プラズモン共鳴バイオセンサ上にプローブ分子が固定されたDNAチップを用いて、その表面にハイブリダイゼーションを介して結合固定されたDNA断片は、表面プラズモン共鳴現象を利用して検出することができる。

## 【0013】

また、DNAチップの基板として、電荷結合素子（CCD）を用いることも知られている（Nucleic Acids Research, 1994, Vol.22, No.11, 2124-2125）。

## 【0014】

いずれの結合タイプのDNAチップを用いる核酸断片試料などの試料分子の分析方法においても、その分析操作は、まず高密度に区画された各領域毎に一群のプローブ分子が固定されたDNAチップの表面に、標識（例、蛍光標識）が付付けられた検出対象の核酸断片試料などの試料分子が溶解もしくは分散された試料水溶液を点着し、その状態にて一定時間保持した後、該表面から試料水溶液を除去し、次いで該表面を水性液で洗浄する方法が利用される。このようにして、DNAチップ表面のプローブ分子と特異的に結合した試料分子以外の試料分子を除去した後、DNAチップの該表面を乾燥させ、次いで、蛍光標識などの標識に対応する標識検知方法を利用して、各領域のプローブ分子群に対する試料分子の固定状態を定性的あるいは定量的に測定する。

## 【0015】

DNAチップ表面のプローブ分子に特異的に結合固定された標識付き試料分子の検出は、例えば、標識として蛍光標識を用いた場合には、蛍光法を利用して行

なわれるが、この蛍光法による標識試料分子の検出は、プローブ分子に特異的に結合固定された試料分子の蛍光標識以外から発生する蛍光による検出感度あるいは検出精度などの検出特性の低下が問題となりやすい。すなわち、所定の蛍光標識以外にも、さまざまな物質が蛍光を発することがあり、また所定の特異的結合以外のモードでプローブ分子に不完全に結合した蛍光標識付き試料分子がDNAチップの表面に残留することが少なからずあるため、それらが蛍光測定操作でのバックグラウンド値を上昇させる傾向がある。特異的結合によりプローブ分子に結合した蛍光標識試料分子の検出は、結合した試料分子の蛍光標識が発する蛍光の強度と、その周囲のバックグラウンド値（バックグラウンド蛍光強度）との差を利用して実施するため、バックグラウンド値の上昇は、検出感度あるいは検出精度の低下を引き起こす結果となる。

## 【0016】

上記のバックグラウンド値を低減するために、DNAチップの表面の不正規の活性部位（すなわち、試料分子が、所定の特異的結合反応によらずにDNAチップ表面に結合し、残留する部位）を不活性化するブロック処理を、DNAチップの製造後に、あるいはDNAチップを検出操作に用いる前に施すことが知られている。

## 【0017】

DNAチップ表面に施すブロック処理としては、従来より各種用途に一般的に使用されている洗浄液であるデンハルト液を用いてDNAチップの表面を洗浄する方法が利用されている。また、プローブ分子を基板表面に共有結合で固定したDNAチップについて、モノエタノールミンの水溶液で処理してブロック処理する技術も知られている（3D-リンクのプロトコール、サー・モディクス・インク社）。

## 【0018】

特表平11-514872号公報には、DNAチップ表面にブロック処理を無水コハク酸もしくはその類縁体を用いてブロック処理を施して、非特異的バックグラウンドを低減することの発明が開示されている。

## 【0019】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明の発明者の研究によると、上記のような従来から利用され、あるいはこれまでに提案されたブロッキング剤を用いたDNAチップのブロック処理は、一定のブロック効果が得られるものの、そのバックグラウンド値の低下をもたらす効果は必ずしも充分とは言えないことが判明した。

## 【0020】

また、従来から利用され、あるいはこれまでに提案されているブロッキング剤を用いてブロック処理を行なうと、DNAチップに結合固定されていたプローブ分子の一部が離脱流失し、この離脱プローブ分子の一部がDNAチップの表面に所定領域以外の場所に残留するため、DNAチップのプローブ領域（スポット）の周囲にも、核酸断片試料との特異的に結合する領域（不正規結合領域）が生成する傾向がある。このような不正規結合領域の生成は、ハイブリダイゼーションを利用する核酸断片試料の検出時において、プローブ領域（スポット）の範囲の確認を困難にするため、検出精度の低下を引き起こすことになる。

## 【0021】

従って、本発明は、基板などの固相担体表面に、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、ペプチド核酸などのヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体を結合固定させたDNAチップのバックグラウンド値の低下のためのブロック処理に効率良く利用できる処理方法、そしてその処理に有利に利用できる処理液組成物を提供することを主な目的とする。また、本発明は、検出感度や検出精度などの検出特性が向上したDNAチップを提供することも、その目的とする。

## 【0022】

## 【課題を解決するための手段】

本発明は、固相担体の表面に備えられた一群の荷電性の反応性基Xに、一方の端部もしくはその近傍に該反応性基Xと反応して共有結合を形成する反応性基Eを持ち、他方の端部もしくはその近傍に反応性基Eと同一もしくは異なる反応性基Gを有する化合物を反応させることにより作成した、先端部もしくはその近傍に反応性基Gを有する一群の反応性連結基を備えた反応性固相担体に、該反応性基Gと反応して共有結合を形成する反応性基Qを一方の端部もしくはその近傍に

持つ一群のプローブ分子を接触させることによって、該反応性基Qと反応性基Gとの反応により生成する共有結合を介して、連結基にプローブ分子を結合させることにより製造した、該プローブ分子に特異的に結合する試料分子を結合固定するための試料分子の検出具の検出特性を向上させる方法であって、該検出具に対して、荷電性の反応性基Xが水性媒体中で示す電荷と逆側の電荷を水性媒体中で示す荷電性化合物と接触させる処理、及び反応性基Gと反応して、その反応性基Gを不活性化する化合物を接触させる処理とを含むブロック処理を水性媒体の存在下にて施し、次いで洗浄処理を施すことからなる方法にある。

## 【 0 0 2 3 】

上記の方法に於いて、検出具のブロック処理の際に用いる水性媒体に界面活性剤、特に陰イオン性界面活性剤が更に含まれていることが望ましい。

## 【 0 0 2 4 】

本発明はさらに、正の電荷を示すアミノ基含有化合物（例、グリシン）、負の電荷を示す酸性化合物（例、デキストラン硫酸）、そして陰イオン性界面活性剤（例、ドデシル硫酸ナトリウム）が水性媒体に溶解されてなる、ブロッキング剤水溶液として有利に用いることのできる水性組成物にもある。

## 【 0 0 2 5 】

本発明はまた、固相担体の表面に備えられた一群の荷電性基に、該荷電性基が水性媒体中で示す電荷と逆側の電荷を水性媒体中で示す荷電性基を一方の端部もしくはその近傍に持つ一群のプローブ分子を接触させることによって、該プローブ分子を固相担体の表面に静電結合により固定して製造した、該プローブ分子に特異的に結合する試料分子を結合固定するための試料分子の検出具の検出特性を向上させる方法であって、該検出具に対して、固体表面に備えられた荷電性基が水性媒体中で示す電荷と逆側の電荷を水性媒体中で示す荷電性化合物と接触させる処理を含むブロック処理を水性媒体の存在下にて施し、次いで洗浄処理を施すことからなる方法にもある。

## 【 0 0 2 6 】

上記の方法に於いても、検出具のブロック処理の際に用いる水性媒体に界面活性剤、特に陰イオン性界面活性剤が更に含まれていることが望ましい。

【 0 0 2 7 】

【発明の実施の形態】

本発明のブロック処理の対象となるプローブ分子を備えた検出器具について、その代表例であるDNAチップを例にとり、また添付図面を参照しながら次に説明する。

【 0 0 2 8 】

本発明のブロック処理は、DNAチップのプローブ分子が備えられた表面部分を、DNAチップの製造後、あるいはDNAチップを実際の試料分子の検出操作に用いる前に、特定の水性液体混合物で処理することを特徴としている。処理対象のDNAチップは、プローブ分子がチップ表面に共有結合で固定されたタイプのもの（以下、共有結合DNAチップと呼ぶ）でもよく、プローブ分子がチップ表面に静電的な結合で固定されたタイプのもの（以下、静電結合DNAチップと呼ぶ）であってもよく、また両者を併用したものでもよい。

【 0 0 2 9 】

〔共有結合DNAチップのブロック処理〕

本発明に従う共有結合DNAチップのブロック処理の原理を、添付図面の第1図を参照しながら説明する。

共有結合タイプのDNAチップの製造方法の代表的な操作として、固相担体の表面に、アミノ基含有ポリマーによる処理あるいはシランカップリング剤による処理などによってアミノ基のような、水性液中で荷電する（アミノ基の場合には正に荷電する）反応性基を導入し、次いで、このアミノ基などの反応性基と反応する基を一方の端部に有し、かつ他方の端部にも反応性基を持つ二官能化合物を接触させることによって反応性固体担体を作成し、次いで、この反応性固体担体とプローブ分子の反応性基とを接触させて、該プローブ分子を固相担体に結合固定させる操作を挙げることができる。

【 0 0 3 0 】

上記の共有結合チップの製造方法と、本発明に従うブロック操作の原理が第1図に示されている。

先ず、共有結合タイプのDNAチップの製造プロセスを説明する。

(1) 最初に、固相担体 (I) の表面に備えられた一群の荷電性の反応性基 X (第 1 図では正の荷電性を示すものとして  $X^+$  にて示している) に、一方の端部もしくはその近傍に該反応性基 X と反応して共有結合を形成する反応性基 E を持ち、他方の端部もしくはその近傍に反応性基 E と同一もしくは異なる反応性基 G を有する化合物 (連結基を構成する化合物) を反応させることにより、先端部もしくはその近傍に反応性基 G を有する一群の反応性連結基を備えた反応性固相担体 (II) を作成する。

## 【0031】

(2) 次に、反応性固相担体 (II) の反応性基 G と反応して共有結合を形成する反応性基 Q を一方の端部もしくはその近傍に持つ一群のプローブ分子を接触させることによって、反応性基 Q と反応性基 G との反応により生成する共有結合を介して、連結基にプローブ分子を結合させ、目的とする共有結合チップ (III) が得られる。

## 【0032】

上記方法により得られた共有結合タイプの DNA チップでは、第 1 図に模式的に示すように、固相担体に予め導入された荷電性の反応性基 X ( $X^+$ ) の一部、そして連結基の反応性基 G の一部が未反応のままで残留する。このため、試料分子の検出操作時において、それらの未反応基が、アミノ基などの反応性基とリン酸基部分とを持ち、また陰イオン性の蛍光標識を付けた核酸断片試料と、検出反応である特異的結合反応を介することなく、DNA チップの表面に結合固定されることになり、検出操作時において、バックグラウンド値の上昇をもたらし、検出感度などの検出特性の低下を引き起こす。

## 【0033】

次に、上記の方法により得られた共有結合タイプの DNA チップのブロック処理について説明する。

(1) 共有結合チップ (III) を、その荷電性の反応性基 X ( $X^+$ ) が水性媒体中で示す電荷と逆側の電荷 ( $Z^-$ ) を水性媒体中で示す荷電性化合物と接触させる処理、及び反応性基 G と反応して、その反応性基 G を不活性化する基 (T) を持つ化合物を接触させる処理を、水性媒体の存在下にて、同時にあるいは任意の順



に施すことにより、未反応の反応性基  $X(X^+)$  (反応性基  $X$  が反応性基  $E$  と反応して共有結合を形成した後も荷電性を示す場合には、その  $X^+-E$  の部分についても) を荷電性化合物の電荷 ( $Z^-$ ) でブロックし、また未反応の反応性基  $G$  についても不活性化する基 ( $T$ ) を持つ化合物でブロックする。これらの水性媒体には、ブロック処理の効率化のために、界面活性剤、特に陰イオン界面活性剤を添加しておくことが望ましい。なお、ブロック処理に用いる反応性基  $G$  を不活性化する基 ( $T$ ) を持つ化合物及び荷電正化合物は、検出対象の試料分子に対して親和性がないか、あるいは少ないことが必要があることは勿論である。

## 【0034】

(2) 次いで、上記のブロック処理を施した共有結合チップを、水、特に沸騰水あるいはアルコールなどの親水性有機溶媒を用いて洗浄する処理を行なう。

そして、このようなブロック処理を施した DNA チップ (IV) を、標識を付けた核酸断片などの試料分子の検出作業に用いる。

## 【0035】

## [静電結合 DNA チップのブロック処理]

本発明に従う静電結合 DNA チップのブロック処理の原理を、次に添付図面の第 2 図を参照しながら説明する。

まず、固相担体 (I) の表面に備えられた一群の荷電性基  $X$  に、該荷電性基  $X$  が水性媒体中で示す電荷 (第 2 図では正の荷電性を示すものとして  $X^+$  にて示している) と逆側の電荷を水性媒体中で示す荷電性基 ( $J^-$ ) を一方の端部もしくはその近傍に持つ一群のプロブ分子を接触させることによって、該プロブ分子を固相担体の表面に静電結合により固定されて、静電結合タイプの DNA チップ (IIIB) が得られる。

## 【0036】

そして、このようにして製造した静電結合 DNA チップ (IIIa) を、固体表面の荷電性基 ( $X$ ) が水性媒体中で示す電荷 ( $X^+$ ) と逆側の電荷 ( $Z^-$ ) を水性媒体中で示す荷電性化合物と接触させて、未結合の荷電基 ( $X^+$ ) を電荷 ( $Z^-$ ) を持つ荷電性化合物でブロックする処理を行ない、その後、水、特に沸騰水あるいはアルコールなどの親水性有機溶媒を用いて洗浄する処理を行なう。ブロック処

理に用いる水性媒体には、ブロック処理の効率化のために、界面活性剤、特に陰イオン界面活性剤を添加しておくことが望ましい。なお、ブロック処理に用いる荷電正化合物は、検出対象の試料分子に対して親和性がないか、あるいは少ないことが必要があることは勿論である。

## 【0037】

そして、このようなブロック処理を施したDNAチップ(IVa)を、標識を付けた核酸断片などの試料分子の検出作業に用いる。

## 【0038】

本発明に従うブロック処理の対象となる検出具に於いて、固相担体は、特に疎水性、あるいは親水性の低い、表面が平滑な基板であることが好ましい。また、その表面が凹凸を有する平面性の低い基板も用いることができる。固相担体の材質としては、ガラス、セメント、陶磁器等のセラミックスもしくはニューセラミックス、ポリエチレンテレフタレート、酢酸セルロース、ビスフェノールAのポリカーボネート、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート等のポリマー材料、シリコン、活性炭、多孔質ガラス、多孔質セラミックス、多孔質シリコン、多孔質活性炭、織編物、不織布、濾紙、短繊維、メンブレンフィルターなどの各種の多孔質物質を挙げることができる。多孔質物質の細孔の大きさは、2乃至1000nmの範囲にあることが好ましく、2乃至500nmの範囲にあることが特に好ましい。固相担体の材質は、ガラスもしくはシリコンであることが特に好ましい。これは、表面処理の容易さや電気化学的方法による解析の容易さによるものである。固相担体の厚さは、100乃至2000 $\mu$ mの範囲にあることが好ましい。

## 【0039】

上記の固相担体としては、従来よりDNAチップの製造に用いられているか、あるいはDNAチップの製造用として提案されている各種の固相担体が好ましく利用することができる。そのような固相担体の例としては、ガラス基板、樹脂基板、シランカップリング剤で表面処理されたガラス基板もしくは樹脂基板、あるいは表面に被覆層を有するガラス基板もしくは樹脂基板などを挙げることができる。固相担体としては、特に、ケイ酸ガラス基板、シランカップリング剤で表面

処理されたケイ酸ガラス基板、あるいは有機質被覆層で被覆されたケイ酸ガラス基板であることが好ましい。また、電気化学的な分析方法に用いるDNAチップの基板として用いられる電極基板であってもよい。また、前述の表面プラズモン共鳴（SPR）バイオセンサ用基板、電荷結合素子（CCD）などの各種の機能性基板であってもよい。さらに、これらの基板以外にも、粒子状の固相担体なども用いることができる。

## 【0040】

固相担体の表面には、ジビニルスルホン化合物などの二官能反応性化合物を共有結合により固定するために、あるいは荷電性基を有する試料分子（例、DNA断片）の静電的な固定するために、ポリ陽イオン化合物（例えば、ポリ-L-リシン、ポリエチレンイミン、ポリアルキルアミン等であることが好ましく、ポリ-L-リシンであることがさらに好ましい）などのアミノ基を側鎖に有するポリマーによって被覆処理（この場合、固相担体表面へ導入される反応性基は、アミノ基である）を施すことが望ましい。あるいは、固相担体表面は、シランカップリング剤などの固相担体表面と反応する反応性基と、そして別にアミノ基などの反応性基を有する表面処理剤によって表面処理することができる。

## 【0041】

固相担体表面は、ポリ陽イオン化合物による被覆処理の場合には、アミノ基がポリマー化合物と固体担体表面との静電結合によって固相担体表面に導入されるのに対して、シランカップリング剤による表面処理の場合には、固相担体表面に共有結合によって結合固定されるため、アミノ基などが固相担体表面に安定に存在する。アミノ基の外に、メルカプト基、アルデヒド基、カルボキシル基、あるいは水酸基も好ましく導入することができる。

## 【0042】

アミノ基を有するシランカップリング剤としては、 $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシラン、N- $\beta$ （アミノエチル）- $\gamma$ -アミノプロピルトリメトキシシランあるいはN- $\beta$ （アミノエチル）- $\gamma$ -アミノプロピルメチルジメトキシシランが一般的に用いられる。

## 【0043】

ポリ陽イオン化合物を用いる処理に、シランカップリング剤による処理を組み合わせてもよい。この方法により、疎水性、あるいは親水性の低い固相担体とDNA断片などのプローブ分子との静電的な相互作用を促進することができる。ポリ陽イオン化合物による処理がされた固相担体表面上に、さらに、電荷を有する親水性高分子等からなる層や架橋剤からなる層を設けてもよい。このような層を設けることによって、ポリ陽イオン化合物による処理がされた固相担体の凹凸を軽減することができる。固相担体の種類によっては、その担体中に親水性高分子等を含むさせることも可能である。

## 【0044】

通常のDNAチップ用の固相担体の表面には、予め区画あるいは想定された多数の領域が設定されており、各領域毎にアミノ基のような水性媒体中で荷電性を示す反応性基あるいは非反応性基が予め導入されている。用いる固相担体の各領域の表面のそれぞれには、上記のアミノ基あるいはヒドロキシル基などの荷電性の反応性基が備えられているが、そのような反応性基を持たない固相担体には、前述のように、シランカップリング剤による表面処理、あるいはアミノ基などの反応性基を側鎖に有するポリマーなどを固相担体の表面に塗布被覆する方法を利用して、反応性基の導入が行なわれる。

## 【0045】

上記のような表面処理が予め施された固相担体の市販品の例としては、PLL（シグマ社、ポリ-L-リジンコート）、CMT-GAPS（コーニング社、アミノシランコート）、MAS（松浪ガラス株式会社、アミノシランコート）、シラネイト（グライナー社、ポリシランコート）、シラネイト（テレケム、ポリシランコート）、DNA-Ready Type 1または2スライド（クローンテック社、アミノシランコート）、シリレイト（グライナー社、シランアルデヒドコート）、シリレイト（テレケム社、シランアルデヒドコート）、そして3D-Link（サーモテックス社、活性化カルボン酸処理）などを挙げることができる。

## 【0046】

本発明のブロック処理対象の代表的な共有結合タイプの検出具は、荷電性反応

性基を備えた固相担体〔第1図の(I)〕にジビニルスルホン化合物などのような二官能性化合物を接触させることによって、先端部もしくはその近傍にビニルスルホニル基を持つ連結基を形成した反応性固相担体〔第1図の(II)〕を用いて作成することができる。

【0047】

上記の反応性固相担体は、予め表面に反応性基を導入した固相担体を用意し、この固相担体と、この担体表面に備えられた反応性基と反応して共有結合を形成する反応性基を一方の端部もしくは端部附近に有し、かつ他方の端部もしくは端部附近にビニルスルホニル基もしくはビニルスルホニル基の反応性前駆体基を有する化合物とを接触させることにより製造することができる。

【0048】

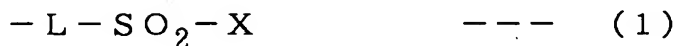
すなわち、反応性基を備えた固相担体は、ジビニルスルホン化合物などの二官能性反応性化合物と接触することによって、その反応性基と二官能性反応性化合物とが反応し、共有結合が形成され、固相担体の反応性基部分が延長され、その先端もしくは先端附近にビニルスルホニル基もしくはその反応性前駆体基を持つ反応性鎖が形成され、これにより反応性固相担体が得られる。

【0049】

上記の反応性固相担体において、固相担体表面に導入されるビニルスルホニル基もしくはその反応性前駆体基と連結基との連結体は、下記の式(1)により表わされるものであることが望ましい。

【0050】

【化3】



【0051】

上記の式(1)において、Xは、 $-CR^1=CR^2R^3$ または $-CHR^1-CR^2R^3Y$ (反応性前駆体基)を表わす。 $R^1$ 、 $R^2$ および $R^3$ は、それぞれ互いに独立に、水素原子、炭素原子数が1乃至6のアルキル基、炭素原子数が6乃至20のアリール基、あるいは炭素原子数が1乃至6のアルキル鎖を有する合計炭素原子数が7乃至26のアラルキル基を表わす。炭素原子数が1乃至6のアルキル基の

例としては、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、*n*-ブチル基、及び *n*-ヘキシル基を挙げることができ、メチル基であることが特に好ましい。アリール基としては、フェニル基及びナフチル基を挙げることができる。 $R^1$ 、 $R^2$ 及び $R^3$ は共に水素原子であることが好ましい。

## 【0052】

Yは、 $-OH$ 、 $-OR^0$ 、 $-SH$ 、 $NH_3$ 、 $NH_2R^0$ （但し、 $R^0$ は、水素原子を除く、アルキル基などの基である）などの求核試薬によって置換される基、あるいは塩基によって「HY」として脱離する基を表わし、その例としては、ハロゲン原子、 $-OSO_2R^{11}$ 、 $-OCOR^{12}$ 、 $-OSO_3M$ 、あるいは四級ピリジニウム基を表わす（ $R^{11}$ は、炭素原子数が1乃至6のアルキル基、炭素原子数が6乃至20のアリール基、あるいは炭素原子数が1乃至6のアルキル鎖を有する合計炭素原子数が7乃至26のアラルキル基を表わし； $R^{12}$ は、炭素原子数が1乃至6のアルキル基あるいは炭素原子数が1乃至6のハロゲン化アルキル基を表わし；Mは、水素原子、アルカリ金属原子あるいはアンモニウム基を表わす）を挙げることができる。

## 【0053】

Lは、固相担体もしくは固相担体に結合している連結基と、上記 $-SO_2-X$ 基とを連結している二価もしくはそれ以上の連結基を表わす。ただし、Lは単結合であってもよい。二価の連結基としては、炭素原子数が1乃至6のアルキレン基、炭素原子数が3乃至16の脂肪族環基、炭素原子数が6乃至20のアリーレン基、N、SおよびPからなる群より選ばれるヘテロ原子を1乃至3個含む炭素原子数が2乃至20の複素環基、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-SO-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-SO_3-$ 、 $-NR^{11}-$ 、 $-CO-$ およびこれらの組み合わせから群より選ばれる基を一つあるいは複数個組み合わせてなる基であることが好ましい。 $R^{11}$ は、水素原子、炭素原子数が1乃至15のアルキル基、炭素原子数が6乃至20のアリール基、あるいは炭素原子数が1乃至6のアルキル基を有する炭素原子数が7乃至21のアラルキル基であることが好ましく、水素原子もしくは炭素原子数が1乃至6のアルキル基であることがさらに好ましく、水素原子、メチル基もしくはエチル基であることが特に好ましい。Lが $-NR^{11}-$ 、 $-SONR^{11}-$ 、 $-CON$

$R^{11}-$ 、 $-NR^{11}COO-$ 、および $-NR^{11}CONR^{11}-$ からなる群より選ばれる基を二個以上組み合わせてなる基である場合には、それらの $R^{11}$ 同士が結合して環を形成していてもよい。

【0054】

$R^{11}$ のアルキル基、 $R^{11}$ のアリール基、および $R^{11}$ のアラルキル基は、置換基を持っていてもよい。このような置換基としては、水酸基、炭素原子数が1乃至6のアルコキシ基、炭素原子数が1乃至6のアルケニル基、炭素原子数が2乃至7のカルバモイル基、炭素原子数が1乃至6のアルキル基、炭素原子数が2乃至7のアラルキル基、炭素原子数が6乃至20のアリール基、スルファモイル基（もしくはそのNa塩、K塩等）、スルホ基（もしくはそのNa塩、K塩等）、カルボン酸基（もしくはそのNa塩、K塩等）、ハロゲン原子、炭素原子数が1乃至6のアルケニレン基、炭素原子数が6乃至20のアリーレン基、スルホニル基、およびこれらの組み合わせからなる群より選ばれる原子もしくは基を挙げることができる。

【0055】

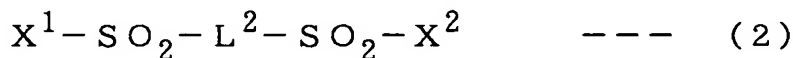
Lとしては、上記式のアルキレン基の水素原子が $-SO_2CH=CH_2$ 基によって置換されてなる基も好ましい。

【0056】

前記の式（1）で表わされるビニルスルホニル基もしくは反応性前駆体基が共有結合により固定された固相担体を得るために利用される二官能反応性化合物としては、下記の式（2）で表わされるジスルホン化合物が有利に利用できる。

【0057】

【化4】



【0058】

【上記の式において、 $X^1$ および $X^2$ は互いに独立に、 $-CR^1=CR^2R^3$ 、または $-CHR^1-CR^2R^3Y$ （反応性前駆体基）を表わし； $R^1$ 、 $R^2$ 及び $R^3$ は、互いに独立に、水素原子、炭素原子数が1乃至6のアルキル基、炭素原子数が6乃至

至 20 のアリール基、及び炭素原子数が 1 乃至 6 のアルキル鎖を有する合計炭素原子数が 7 乃至 26 のアラルキル基からなる群より選ばれる原子もしくは基を表わし；Y は、ハロゲン原子、 $-\text{OSO}_2\text{R}^{11}$ 、 $-\text{OCOR}^{12}$ 、 $-\text{OSO}_3\text{M}$ 、及び四級ピリジニウム基からなる群より選ばれる原子もしくは基を表わし； $\text{R}^{11}$  は、炭素原子数が 1 乃至 6 のアルキル基、炭素原子数が 6 乃至 20 のアリール基、及び炭素原子数が 1 乃至 6 のアルキル鎖を有する合計炭素原子数が 7 乃至 26 のアラルキル基からなる群より選ばれる基を表わし； $\text{R}^{12}$  は、炭素原子数が 1 乃至 6 のアルキル基および炭素原子数が 1 乃至 6 のハロゲン化アルキル基からなる群より選ばれる基を表わし；M は、水素原子、アルカリ金属原子およびアンモニウム基からなる群より選ばれる原子もしくは基を表わし；そして、 $\text{L}^2$  は連結基を表わす]。

## 【 0 0 5 9 】

すなわち、上記の式 (2) で表わされるジスルホン化合物を、前記の固相担体と、例えば水性雰囲気にて、接触させることによって、前記の反応性固相担体を容易に製造することができる。

## 【 0 0 6 0 】

上記の式 (2) で表わされるジスルホン化合物の代表的な例としては、1, 2-ビス (ビニルスルホニルアセトアミド) エタンを挙げることができる。

## 【 0 0 6 1 】

反応性固相担体の製造に使用するジスルホン化合物の合成法については、たとえば、特公昭 47-2429 号、同 50-35807 号、特開昭 49-24435 号、同 53-41551 号、同 59-18944 号等の各種公報に詳細が記載されている。

## 【 0 0 6 2 】

反応性固相担体 (II) を利用して、DNA、RNA、DNA 断片、あるいは RNA 断片などの天然起源のポリヌクレオチドまたオリゴヌクレオチドの検出固定のための検出基 [一般に DNA チップと呼ばれているもの、第 1 図の (III) ] を作成するためには、前記のように、反応性固相担体 (II) を、その担体表面上のビニルスルホニル基もしくはその反応性前駆体基と反応して共有結合を形成する



アミノ基などの反応性基（アミノ基は水性媒体中で正に荷電する）を備えたヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体と接触させる方法が利用される。すなわち、このようにして所望のヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体からなるプローブ分子を備えた検出具（いわゆるDNAチップ）を作成することができる。

## 【0063】

固相基板表面に共有結合を介して結合されたビニルスルホニル基もしくはその反応性前駆体基は、加水分解に対して高い抵抗性を有しているため、容易に安定に保存することができ、また、アミノ基を予め備えているか、あるいはアミノ基などの反応性基が導入されているかヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体の反応性基と迅速に反応して、安定な共有結合を形成することができる。

## 【0064】

プローブ分子として用いるヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体の代表例としては、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、そしてペプチド核酸を挙げることができる。これらのヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体としては、天然起源のもの（DNA、DNA断片、RNA、あるいはRNA断片など）であってもよく、あるいは合成化合物であってもよい。また、ヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体としては、その糖単位部分に架橋基を有するLNAと呼ばれる化合物（J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 13252-13253に記載）などの各種の類縁化合物が含まれる。

## 【0065】

プローブ分子としてDNA断片を用いる場合は、目的によって二通りに分けることができる。遺伝子の発現を調べるためには、cDNA、cDNAの一部、EST等のポリヌクレオチドを使用することが好ましい。これらのポリヌクレオチドは、その機能が未知であってもよいが、一般的にはデータベースに登録された配列を基にしてcDNAのライブラリー、ゲノムのライブラリーあるいは全ゲノムをテンプレートとしてPCR法によって増幅して調製する（以下、「PCR産物」という）。PCR法によって増幅しないものも、好ましく使用することができる。また、遺伝子の変異や多型を調べるには、標準となる既知の配列をもとにして、変異や多型に対応する種々のオリゴヌクレオチドを合成し、これを使用す

ることが好ましい。さらに、塩基配列の分析を目的とする場合、 $4^n$  ( $n$ は、塩基の長さ) 種のオリゴヌクレオチドを合成して、それらを使用することが好ましい。DNA断片の塩基配列は、一般的な塩基配列決定法によって予めその配列が決定されていることが好ましい。DNA断片は、2乃至50量体であることが好ましく、10乃至25量体であることが特に好ましい。

## 【0066】

オリゴヌクレオチドやDNA断片などのヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体の一方の末端には、前記のビニルスルホン基もしくはその反応性前駆体基と反応して共有結合を形成する反応性基を導入する。このような反応性基は、アミノ基、イミノ基、ヒドラジノ基、カルバモイル基、ヒドラジノカルボニル基、もしくはカルボキシイミド基であることが好ましく、アミノ基であることが特に好ましい。オリゴヌクレオチドやDNA断片には、通常、クロスリンカーを介してこれらの反応性基が結合される。クロスリンカーとしては、たとえば、アルキレン基あるいはN-アルキルアミノ-アルキレン基が利用されるが、ヘキシレン基あるいはN-メチルアミノ-ヘキシレン基であることが好ましく、ヘキシレン基であることが特に好ましい。なお、ペプチド核酸(PNA)はアミノ基を有しているため、通常は、改めて別に反応性基を導入する必要はない。

## 【0067】

なお、共有結合タイプのDNAチップの製造に利用される二官能化合物(三官能以上の化合物であってもよい)は、上記のジビニルスルホン化合物に限られるものではないことは勿論である。

## 【0068】

前記のように、本発明のブロック処理は、静電結合によりプローブ分子が結合したタイプのDNAチップに対しても利用可能である。この静電結合によりプローブ分子が結合したDNAチップの代表例としては、アミノ基が表面に導入された固相担体に、リン酸基を有するDNA断片プローブを水性媒体の存在下に接触させて、アミノ基の正の電荷とリン酸基の負の電荷を利用して静電結合させたものを挙げることができる。

## 【0069】

本発明のブロック処理に用いるブロッキング剤組成物は、共有結合タイプの検出基の処理については、検出基の固相担体の表面に導入された荷電性の反応性基が水性媒体中で示す電荷と逆側の電荷を水性媒体中で示す荷電性化合物、そしてその荷電性の反応基の上に連結基を介して延びた反応性基と反応して、後者の反応性基を不活性化する化合物とを含むものである。これらの化合物は同時のブロッキング処理のために予め混合して得た水性組成物として使用してもよく、あるいはそれぞれ単独の水溶液として使用してもよい。また、これらのブロッキング剤を含む水溶液には陰イオン界面活性剤などの界面活性剤を添加することが好ましい。

#### 【0070】

具体的には、固相担体の表面に荷電性の反応性基としてアミノ基を導入し、連結基の先端附近に備えられた反応性基がビニルスルホニル基である場合には、ブロッキング処理のための荷電性化合物は、デキストラン硫酸、スルホニル基を有するムコ多糖類、スルホニル基を有するタウリン、カルボキシル基を有するポリペプチド、カルボキシル基を有する多糖類などの酸性基を有する高分子量の化合物が好ましく利用でき、反応性基を不活性化する化合物としては、アミノ基、メルカプト基、ヒドロキシル基などの活性水素を有する化合物（例、グリシン）が好ましく利用できる。グリシンは、上記のブロック処理において緩衝剤としても機能するため好ましい。また、界面活性剤としては、アルキルベンゼンスルホン酸塩、ラウリル硫酸エステル塩、スルホコハク酸オクチルエステル塩、ステアリン酸石けんなどの陰イオン（アニオン）性界面活性剤、ノニルフェノール、ラウリルアルコール、ポリエチレングリコールなどの非イオン（ノニオン）性界面活性剤、そしてセチルピリジニウムクロライド、ラウリルジメチルベンジルアンモニウムクロライド、ステアリルトリメチルアンモニウムクロライドのような陽イオン（カチオン）界面活性剤が、利用するブロック処理のイオン雰囲気 considering して、任意に選ばれる。

#### 【0071】

静電結合タイプの検出基の処理に用いるブロッキング剤組成物は、検出基の固相担体の表面に導入された荷電性基が水性媒体中で示す電荷と逆側の電荷を水性

媒体中で示す荷電性化合物を含むものである。ブロッキング剤を含む水溶液には上記のような界面活性剤を添加することが好ましい。

## 【0072】

具体的には、固相担体の表面に荷電性基として水性媒体中で正に荷電するアミノ基を導入してある場合には、ブロッキング処理のための荷電性化合物は、デキストラン硫酸、スルホニル基を有するムコ多糖類、スルホニル基を有するタウリン、カルボキシル基を有するポリペプチド、カルボキシル基を有する多糖類などの酸性基を有する高分子量の化合物が好ましく利用できる。なお、このブロック処理において緩衝剤として機能するグリシンなどの緩衝性化合物を添加することも好ましい。従って、共有結合タイプのDNAチップのブロック処理に用いられる前述のブロッキング剤組成物を、この静電結合タイプのDNAチップのブロック処理に用いることもできる。

## 【0073】

本発明のブロック処理を施した検出具を用いての試料分子の検出は、公知のDNAチップを用いての相補性核酸断片試料の検出と同様な操作を行なうことによって、実施できる。

## 【0074】

核酸断片試料としては、通常、その配列や機能が未知であるDNA断片試料あるいはRNA断片試料などの核酸断片試料が用いられる。

## 【0075】

核酸断片試料は、遺伝子発現を調べる目的では、真核生物の細胞や組織サンプルから単離することが好ましい。試料がゲノムならば、赤血球を除く任意の組織サンプルから単離することが好ましい。赤血球を除く任意の組織は、抹消血液リンパ球、皮膚、毛髪、精液等であることが好ましい。試料がmRNAならば、mRNAが発現される組織サンプルから抽出することが好ましい。mRNAは、逆転写反応により標識dNTP（「dNTP」は、塩基がアデニン（A）、シトシン（C）、グアニン（G）もしくはチミン（T）であるデオキシリボヌクレオチドを意味する。）を取り込ませて標識cDNAとすることが好ましい。dNTPとしては、化学的な安定性のため、dCTPを用いることが好ましい。一回のハ

イブリダイゼーションに必要な mRNA 量は、点着する液量や標識方法によって異なるが、数  $\mu\text{g}$  以下である。なお、ヌクレオチド誘導体もしくはその類縁体固定固相担体上の DNA 断片がオリゴ DNA である場合には、核酸断片試料は低分子化しておくことが望ましい。原核生物の細胞では、mRNA の選択的な抽出が困難なため、全 RNA を標識することが好ましい。

## 【0076】

核酸断片試料は、遺伝子の変異や多型を調べる目的では、標識プライマーもしくは標識 dNTP を含む反応系において標的領域の PCR を行なって得ることが好ましい。

## 【0077】

核酸断片試料は通常、ハイブリダイゼーションにより結合固定された試料の検出を可能にするために各種の標識がなされる。標識方法としては、RI 法と非 RI 法（蛍光法、ビオチン法、化学発光法等）とが知られているが、本発明では蛍光法を用いることが好ましい。蛍光標識に利用される蛍光物質としては、核酸の塩基部分と結合できるものであれば何れも用いることができるが、シアニン色素（例えば、市販の CyDye シリーズの Cy3、Cy5 等）、ローダミン 6G 試薬、N-アセトキシ-N'-2-アセチルアミノフルオレン（AAF）あるいは AAF（AAF のヨウ素誘導体）を使用することができる。

## 【0078】

ハイブリダイゼーションは通常、96 穴もしくは 384 穴プラスチックプレートに分注しておいた、標識した核酸断片試料が溶解あるいは分散してなる水性液を、プローブ分子を固定した固相担体（検出基）の表面に点着することによって実施する。点着量は通常、1 乃至 100 nL の範囲にある。ハイブリダイゼーションは通常、室温乃至 70℃ の温度範囲で、そして 6 乃至 2.0 時間の範囲で実施する。ハイブリダイゼーションの終了後は、界面活性剤と緩衝液との混合溶液を用いて洗浄を行い、未反応の核酸断片試料を除去する。界面活性剤としては、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）が通常用いられる。緩衝液としては、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、トリス緩衝液、グッド緩衝液等が通常用いられる。

【 0 0 7 9 】

【実施例】

【実施例 1】 共有結合タイプの DNA チップのブロック処理 (1)

【 0 0 8 0 】

(1) ビニルスルホニル基が導入された基板の作成

2 重量% アミノプロピルエトキシシラン (信越化学工業 (株) 製) のエタノール溶液に、スライドガラス (2 5 m m × 7 5 m m) を 1 0 分間浸漬した後、これを取り出し、エタノールで洗浄した後、1 1 0 °C で 1 0 分間乾燥して、シラン化合物被覆スライドを作成した。次に、このシラン化合物被覆スライドの表面に、5 重量% 1, 2 -ビス (ビニルスルホニルアセトアミド) エタンのリン酸緩衝液 (p H 8 . 5) 溶液をスポットし、1 時間経過後、アセトニトリルで洗浄し、減圧下にて 1 時間乾燥し、表面にビニルスルホニル基がスポット状に導入された反応性基板を得た。

【 0 0 8 1 】

(2) 共有結合タイプの DNA チップの作成

二本鎖 DNA (4 5 4 b p) の一方の鎖の 5' 末端がアミノ基で修飾されている DNA 断片 (プローブ分子) を滅菌水に分散して調製した水性分散液 (1 × 1 0<sup>-6</sup> M) を、上記 (1) で得た反応性基板に点着し、調湿下で一晩放置することにより、プローブ分子を反応性基板の表面に共有結合により結合固定させて、プローブ分子が共有結合によりアレイ状に結合固定された DNA チップを得た。

【 0 0 8 2 】

(3) ブロック処理

上記 (2) で得られた DNA チップについて、下記のブロッキング剤溶液のいずれかに 3 0 分間浸漬するブロック処理を行なった。

A : 市販のデンハルト溶液を 1 0 倍に希釈した水溶液

B : グリシン水溶液 [0 . 1 M グリシン + 0 . 1 M N a C l (p H 8 . 5) ]

C : 本発明ブロッキング剤水溶液 [0 . 1 M グリシン、0 . 1 M 塩化ナトリウム (p H 8 . 5) 、0 . 2 % S D S (ドデシル硫酸ナトリウム) 、2 % デキストラン硫酸]

DNAチップは、上記のブロッキング剤水溶液でブロック処理を行なった後、95℃、3分間の加熱処理を行ない、次いで、冷エタノール中に3分間浸漬し、次いで乾燥した。

## 【0083】

## (4) 試料分子固定操作 (ハイブリダイゼーション)

一方の鎖の5'末端が蛍光標識 (FluoroLink Cy5、アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製) で標識された454bpの試料DNAをハイブリダイゼーション用水溶液 (5×SSC溶液+0.5重量% SDS) 50μLに分散した水性液を、上記(2)で作成し、上記(3)でブロック処理したDNAチップのそれぞれの表面に点着し、該表面を顕微鏡用カバーガラスで覆ったのち、調湿されたチャンバー内で60℃、20時間のインキュベートを行なった。インキュベートしたDNAチップを、室温での0.1重量%と2×SSC混合水溶液による洗浄、37℃での0.1重量%と0.2×SSC混合水溶液による洗浄、ついで室温での0.2×SSC水溶液による洗浄からなる一連の洗浄操作にかけた。洗浄処理したDNAチップは、ついで600rpm、20秒間の遠心操作にかけた後、室温で乾燥した。

## 【0084】

## (5) DNAチップ表面の蛍光法による測定

上記(4)のハイブリダイゼーション処理され各DNAチップの表面に固定された試料分子の分布を蛍光法を利用して調べ、また各DNAチップのバックグラウンド蛍光強度を測定した。

## 【0085】

## (6) 測定結果

各DNAチップの表面に固定された試料分子の分布を示す蛍光強度像を添付図面の第3図に示す。

各DNAチップのバックグラウンド蛍光強度は次の通りである。

A (デンハルト溶液希釈液によるブロック処理) : 15000

B (グリシン水溶液によるブロック処理) : 12000

C (本発明ブロッキング剤水溶液によるブロック処理) : 3500

上記の結果から、本発明のブロッキング剤水溶液を用いるブロック処理によって、バックグラウンド蛍光強度が大きく低下し、またハイブリダイゼーションに対応するスポットの形状の乱れが顕著に少なくなっていることが分る。

【 0 0 8 6 】

[実施例 2] 共有結合タイプの DNA チップのブロック処理 (2)

(1) 共有結合タイプの DNA チップの作成

実施例 1 の (1) と (2) に記載の方法と同一の方法により、プローブ分子が共有結合によりアレイ状に結合固定された DNA チップを得た。

【 0 0 8 7 】

(2) ブロック処理

上記 (1) で得られた DNA チップについて、下記のブロッキング剤溶液のいずれかに 30 分間浸漬するブロック処理を行なった。

D グリシン / 界面活性剤水溶液 [0.1 M グリシン + 0.1 M NaCl (pH 8.5) + SDS 0.2 %]

E : グリシン水溶液 [0.1 M グリシン + 0.1 M NaCl (pH 8.5)]

F : 本発明ブロッキング剤水溶液 [0.1 M グリシン、0.1 M 塩化ナトリウム (pH 8.5)、0.2 % SDS (ドデシル硫酸ナトリウム)、2 % デキストラン硫酸]

DNA チップは、上記のブロッキング剤水溶液でブロック処理を行なった後、95℃、3 分間の加熱処理を行ない、次いで、冷エタノール中に 3 分間浸漬し、次いで乾燥した。

【 0 0 8 8 】

(3) 試料分子固定操作 (ハイブリダイゼーション)

実施例 1 の (4) に記載された方法と同一の方法により、ハイブリダイゼーションを行なった。

【 0 0 8 9 】

(4) DNA チップ表面の蛍光法による測定

上記 (3) のハイブリダイゼーション処理され各 DNA チップの表面に固定された試料分子の分布を蛍光法を利用して調べ、また各 DNA チップのバックグラ



ウンド蛍光強度を測定した。

【0090】

(5) 測定結果

各DNAチップの表面に固定された試料分子の分布を示す蛍光強度像を添付図面の第4図に示す。

各DNAチップのバックグラウンド蛍光強度は次の通りである。

D (グリシン/界面活性剤水溶液によるブロック処理) : 7 5 0 0

E (グリシン水溶液によるブロック処理) : 1 4 0 0 0

F (本発明ブロッキング剤水溶液によるブロック処理) : 3 0 0 0

上記の結果から、本発明のブロッキング剤水溶液を用いるブロック処理によって、バックグラウンド蛍光強度が大きく低下し、またハイブリダイゼーションに対応するスポットの形状の乱れが顕著に少なくなっていることが分る。

【0091】

【実施例3】 静電結合タイプのDNAチップのブロック処理

【0092】

(1) 静電結合タイプのDNAチップの作成

二本鎖DNA (4 5 4 b p) の一方の鎖の5' 末端がアミノ基で修飾されているDNA断片 (プローブ分子) を滅菌水に分散して調製した水性分散液 ( $1 \times 10^{-6}$  M) を、DNAマイクロアレイ用シランコートスライド (コーニング社製、CMT-GAPS) に点着し、80℃、1時間の加熱処理を施したのち、120 m J の紫外線照射処理を行なって、プローブ分子が静電結合によりアレイ状に結合固定されたDNAチップを得た。

【0093】

(2) ブロック処理

上記(1) で得られたDNAチップについて、下記のブロッキング剤溶液のいずれかに30分間浸漬するブロック処理を行なった。

G : 市販のデンハルト溶液を10倍に希釈した水溶液

H : 無水コハク酸水溶液 (1-メチル-2-ピロリドン35 mL、0.01 M ホウ酸 (pH 8.0)、そして無水コハク酸5 g を、水315 mL に溶解して得

た水溶液)

I : 本発明ブロッキング剤水溶液 (0. 1 M グリシン、0. 1 M 塩化ナトリウム (p H 8. 5)、0. 2 % S D S (ドデシル硫酸ナトリウム)、2 % デキストラン硫酸)

DNAチップは、上記のブロッキング剤水溶液でブロック処理を行なった後、9 5℃、3 分間の加熱処理を行ない、次いで、冷エタノール中に3 分間浸漬し、次いで乾燥した。

【0 0 9 4】

(3) 試料分子固定操作 (ハイブリダイゼーション)

実施例1の(4)に記載された方法と同一の方法により、ハイブリダイゼーションを行なった。

【0 0 9 5】

(4) DNAチップ表面の蛍光法による測定

上記(3)のハイブリダイゼーション処理され各DNAチップの表面に固定された試料分子の分布を蛍光法を利用して調べ、また各DNAチップのバックグラウンド蛍光強度を測定した。

【0 0 9 6】

(5) 測定結果

各DNAチップの表面に固定された試料分子の分布を示す蛍光強度像を添付図面の第5図に示す。

各DNAチップのバックグラウンド蛍光強度は次の通りである。

G (デンハルト溶液希釈液によるブロック処理) : 8 0 0 0

H (無水コハク酸水溶液によるブロック処理) : 4 5 0 0

I (本発明ブロッキング剤水溶液によるブロック処理) : 2 5 0 0

上記の結果から、本発明のブロッキング剤水溶液を用いるブロック処理によって、バックグラウンド蛍光強度が大きく低下し、またハイブリダイゼーションに対応するスポットの形状の乱れが顕著に少なくなっていることが分る。

【0 0 9 7】

【発明の効果】

本発明のブロック処理が施されたDNAチップなどの検出具は、従来のブロッキング剤を用いてブロック処理された検出具に比べて、ブロック処理が施された検出具を用いて行なわれる検出操作の検出感度や検出精度などの検出特性が顕著に向上する。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

共有結合によりプローブ分子が固定されたDNAチップについての本発明のブロック処理の原理を示す模式図である。

【図 2】

静電結合によりプローブ分子が固定されたDNAチップについての本発明のブロック処理の原理を示す模式図である。

【図 3】

実施例 1 のハイブリダイゼーション操作の結果を示すDNAチップ模式図である。

【図 4】

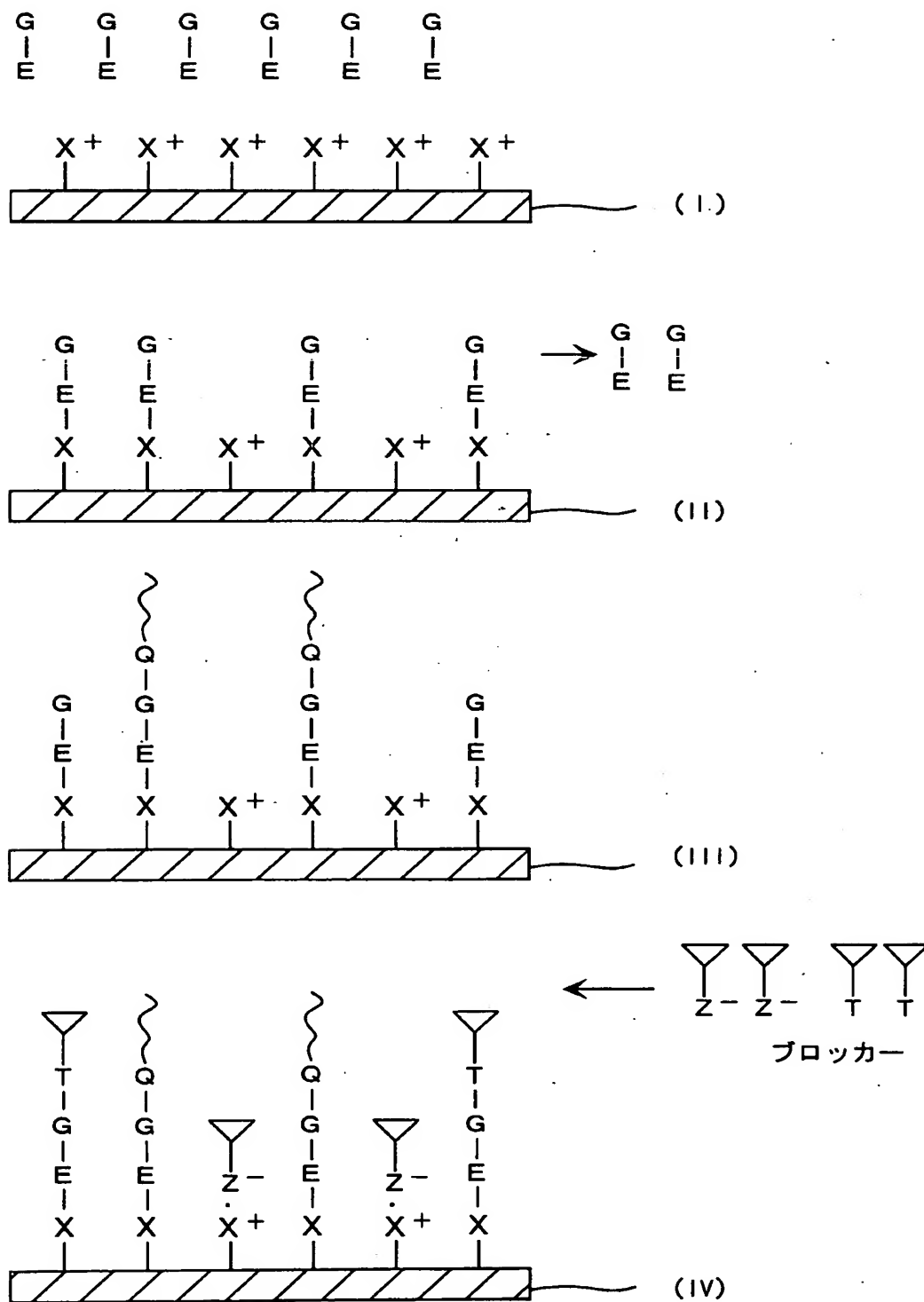
実施例 2 のハイブリダイゼーション操作の結果を示すDNAチップ模式図である。

【図 5】

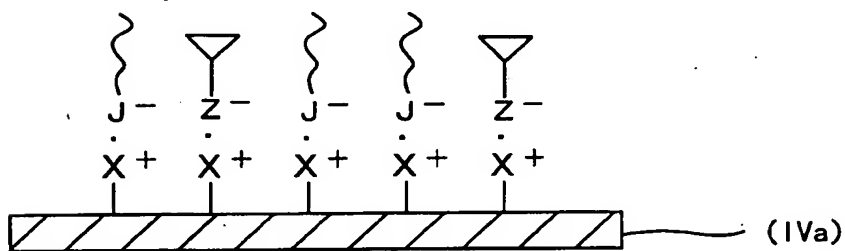
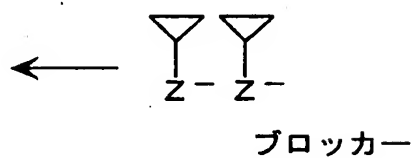
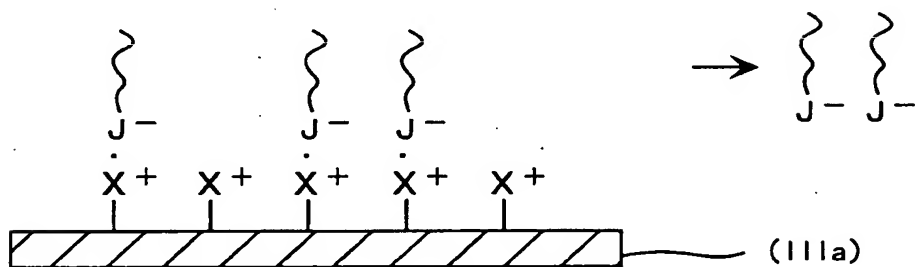
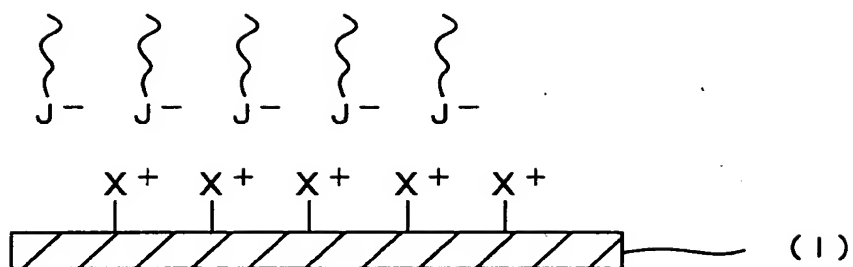
実施例 2 のハイブリダイゼーション操作の結果を示すDNAチップ模式図である。

【書類名】 図面

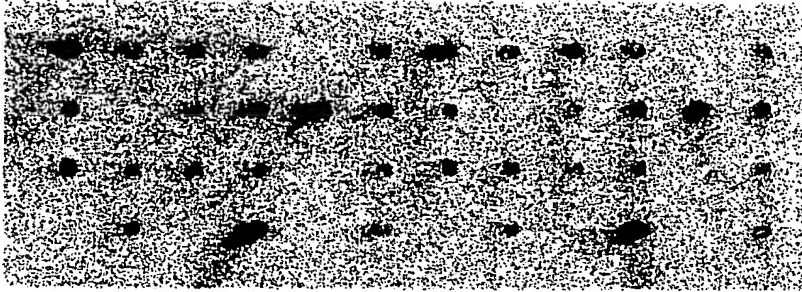
【図 1】



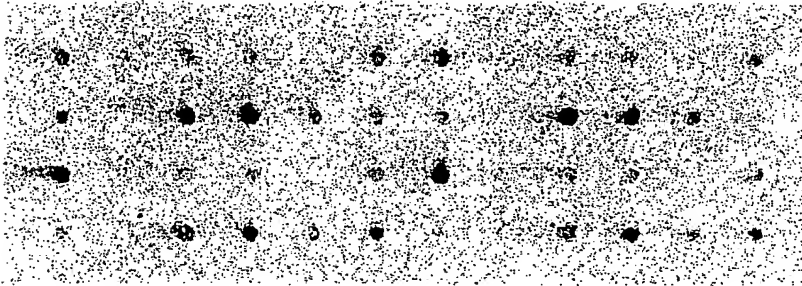
【図 2】



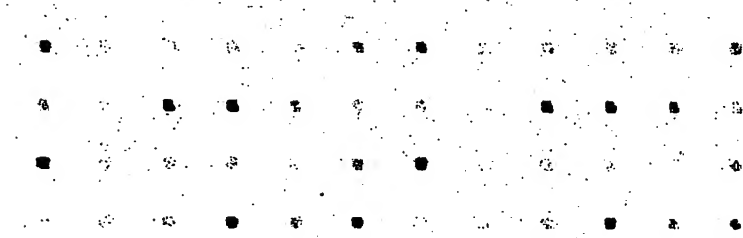
【図 3】



A

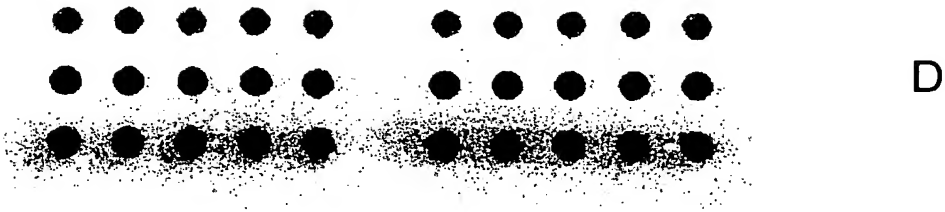


B

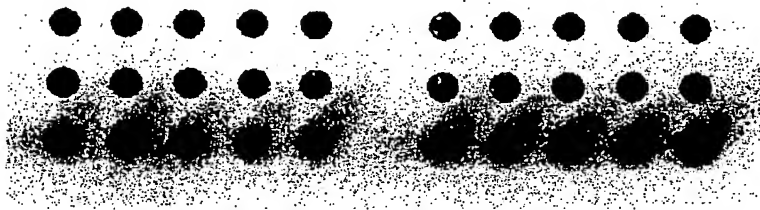


C

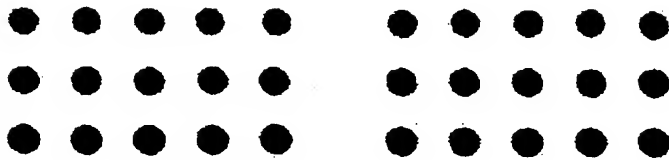
【図 4】



D



E



F

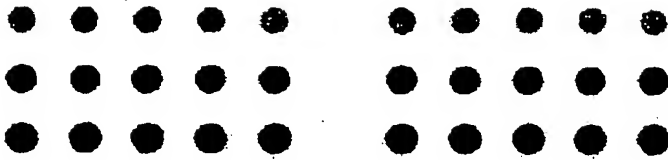
【図 5】



G



H



I



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 DNAチップのブロック方法の提供。

【解決手段】 担体上の荷電性反応性基Xに、一端部に反応性基Xと反応して共有結合を形成する反応性基Eを持ち、他端部に反応性基Gを持つ化合物を反応させて作成した、先端部に反応性基Gを有する連結基を備えた反応性担体に、反応性基Gと反応して共有結合を形成する反応性基Qを一端部に持つプローブ分子を接触させ、反応性基Qと反応性基Gとの反応で生成する共有結合を介して、連結基にプローブ分子を結合させることにより製造した、プローブ分子に特異的に結合する試料分子を固定するための検出具の検出特性を向上させる方法であって、検出具に対して、荷電性反応性基Xが水性媒体中で示す電荷と逆側の電荷を水性媒体中で示す荷電性化合物と接触させる処理、及び反応性基Gと反応して、その反応性基Gを不活性化する化合物を接触させる処理とを含むブロック処理を水性媒体中で施し、次に洗浄処理する方法。

【選択図】 図1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005201]

|          |                 |
|----------|-----------------|
| 1. 変更年月日 | 1990年 8月14日     |
| [変更理由]   | 新規登録            |
| 住 所      | 神奈川県南足柄市中沼210番地 |
| 氏 名      | 富士写真フイルム株式会社    |